



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**TISKOVÉ HLAVY PRO 3D TISK HYDROGELŮ S NÍZKOU
VISKOZITOU**

EXTRUDER HEAD FOR 3D BIOPRINTING OF LOW VISCOSITY HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Václav Havlíček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

BRNO 2018

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Václav Havlíček

ID: 174501

Ročník: 3

Akademický rok: 2017/18

NÁZEV TÉMATU:

Tiskové hlavy pro 3D tisk hydrogelů s nízkou viskozitou

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši dostupných modulů 3D tisku se zaměřením na extruzi hydrogelů o nízké viskozitě. 2) Navrhněte optimální vybavení pro tisk 3D struktur. 3) Navrhněte a realizujte pomocí 3D tiskárny vhodnou tiskovou hlavu pro tisk více hydrogelů v jedné úloze. 4) Navrhněte a realizujte také elektronickou část pro ovládání tiskové hlavy. 5) Provedte diskusi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ATALA Anthony, YOO J. James. Essentials of 3D biofabrication and translation. 1st ed. Academic Press, 2015. ISBN 978-0128009727.

[2] CANESSA Enrique, FONDA Carlo, ZENNARO Marco. Low-cost 3D Printing for Science, Education and Sustainable Development. 1st ed. ICTP, 2013. ISBN 92-95003-48-9.

Termín zadání: 5.2.2018

Termín odevzdání: 25.5.2018

Vedoucí práce: Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

ABSTRAKT

V této bakalářské práci se věnuji 3D biotisku v tkáňovém inženýrství a rozebírám používané materiály a technologie, které lze pro 3D biotisk využít. V práci je také obsažena diskuze vybavení pro 3D biotisk a současné výzvy 3D biotisku metodou extruze. V praktické části je navrženo řešení extruzivního 3D biotisku nízkoviskózních hydrogelů pomocí hydraulické pumpy, vlastní tiskové hlavy a chladicího okruhu.

KLÍČOVÁ SLOVA

3D biotisk, tkáňové inženýrství, hydrogely, extruzivní metoda

ABSTRACT

In this bachelor thesis I deal with 3D bioprinting for tissue engineering and analyze used materials and technologies that can be utilized for 3D bioprinting. The paper also includes a discussion of 3D bioprinting equipment and the current challenges of extrusion 3D bioprinting. In the practical part, a solution of complex system for extrusion 3D bioprinting of low viscosity hydrogels is proposed using a hydraulic pump, a print head and a cooling circuit.

KEYWORDS

3D bioprinting, tissue engineering, hydrogels, extrusion method

HAVLÍČEK, Václav. *Tiskové hlavy pro 3D tisk hydrogelů s nízkou viskozitou*. Brno, 2018, 39 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Tiskové hlavy pro 3D tisk hydrogelů s nízkou viskozitou“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych v první řadě poděkoval vedoucímu diplomové práce panu Ing. Josefu Jarošovi, Ph.D. za odborné vedení, časté konzultace, trpělivost a podnětné návrhy k práci. Děkuji také celému výzkumnému týmu, jmenovitě Ing. Máriu Kandrovi a Bc. Karolíně Spustové. Poděkování patří i celé mé rodině, za podporu během studia a psaní práce. Modelování ve Fusion 360 jsem zvládl díky videům od Larse Christensena, za což mu patří díky.

Brno

.....

podpis autora

OBSAH

Úvod	7
1 Teoretická část studentské práce	8
1.1 Tkáňové inženýrství	8
1.2 Hydrogely	8
1.2.1 Využití hydrogelů v TI	9
1.3 Vlastnosti hydrogelů určených k 3D biotisku	10
1.3.1 Fyzikální kritéria	10
1.3.2 Biologická kritéria	11
1.4 Přírodní a syntetické hydrogely	12
1.5 Metody manipulace s hydrogely	14
1.5.1 Planární Inkjet	14
1.5.2 Elektrospinning	15
1.6 3D biotisk a jeho technologie	17
1.6.1 Extruzivní 3D biotisk	18
1.7 Vybavení pro 3D biotisk	20
1.7.1 Extruzivní metoda	20
1.7.2 Tisková podložka	20
1.7.3 Systém extruze	21
1.7.4 Výzvy 3D tisku	21
1.8 Cíle práce	23
1.8.1 Definice problému	23
2 Praktická část studentské práce	24
2.1 Řešení tiskové hlavy	24
2.2 Hydraulická pumpa	26
2.2.1 Konstrukce	26
2.2.2 Zapojení	27
2.2.3 Řízení	27
2.2.4 Kalibrace pumpy	28
2.3 Tiskový insert	32
2.4 Chladicí okruh	33
2.5 Diskuze výsledků	36
3 Závěr	37
Literatura	38

ÚVOD

3D tisk, neboli aditivní výroba je technologie, která hlavně v posledních patnácti letech otřásá nejen technickým světem (např. rapid prototyping), ale už se šíří i za jeho hranice. Je to hlavně díky jednoduchosti, rychlosti a zároveň dostatečné přesnosti, s jakou je možné „tisknout“.

Novinkou není ani možnost využití této technologie ve zdravotnictví a medicíně, s čímž samozřejmě souvisí použití laboratorní a výzkumné. Ve chvíli, kdy mluvíme o této sféře využití, používáme většinou výrazu „3D biotisk“. Mimo jiné se 3D biotisk využívá i v tkáňovém inženýrství k tisku buněčných struktur a nosičů. Vzhledem ke komplexnosti je zde ovšem mnoho komplikací, a to jak ve volbě tiskové technologie, tak ve volbě materiálu, jeho správné koncentrace atd. Náročnost na 3D biotisk se zvyšuje zvláště ve chvíli, kdy jsou součástí tisknuté směsi i buňky.

Této a další problematice 3D biotisku, včetně popisu jednotlivých technologií, věnuji první (teoretickou) část mé bakalářské práce. V části druhé (praktické) se poté věnuji vlastní úpravě 3D biotiskárny tak, aby vyhovovala požadavkům na ni kladeným v poli tkáňového inženýrství. V rámci této bakalářské práce jsem navrhl a zkonstruoval systém pumpy a tiskové hlavy včetně ovládání a chlazení, který slouží pro tisk hydrogelů s nízkou viskozitou.

1 TEORETICKÁ ČÁST STUDENTSKÉ PRÁCE

1.1 Tkáňové inženýrství

V lidském organismu mají tkáně a orgány různou možnost regenerace. Zatímco třeba játra „dorůstají“ i ze třetiny původní velikosti, plicní tkáň tuto schopnost nemá. Regeneraci tkání a jejich funkci se věnuje regenerativní medicína. Tkáňové inženýrství je pak oborem, ve kterém jde o kombinaci medicíny, biologie a technických věd, a jehož cílem je vývoj umělé tkáně.

Jedním z přístupů tkáňového inženýrství je použití nějakého tkaninového nosiče, podkladu (scaffoldu), na který jsou poté buňky vysazeny, a kultivovány in vitro. Nosič by měl být ideálně porézní, aby se skrz něj dostávala k buňkám výživa, ale zároveň by měl usměrňovat a řídit růst buněk. Nosič tedy vyžaduje poměrně složitou vnitřní i vnější strukturu. Avšak důležité je také rozložení buněk v materiálu, což nelze při osazování nosičů jednoduše zajistit, nicméně lze k tomuto účelu využít metody 3D tisku (resp. 3D biotisku, jak je nazýván 3D tisk za použití biologických materiálů a buněk). Zde mluvíme o přímé metodě, kdy zároveň vzniká nosič i prostorové rozložení buněk v nosiči. Mezi vhodné materiály k tomuto účelu patří hydrogely, které obsahují buňky a po vytisknutí jsou připraveny ke kultivaci.

1.2 Hydrogely

Zatímco v klasickém 3D tisku je většinou „inkoustem“ plast, v 3D biotisku a tkáňovém inženýrství se používají nejčastěji hydrogely, tedy gely s vysokým obsahem vody. Právě schopnost vázat a zadržovat vodu je jedním z hlavních důvodů jejich použití, protože buňky pro svoje přežití vodnaté prostředí potřebují, a to z důvodu výměny živin, odpadních látek a také pro mezibuněčnou komunikaci. Hydrogel vzniká polymerizací - ať už chemickou, nebo fyzikální.

Hydrogely bychom mohli rozdělit na dvě skupiny podle jejich původu, a to na syntetické a přírodní. Mezi nejvíce používané pro tkáňové inženýrství patří polyethylenglykol (PEG) deriváty, např. PEG dimethakrylát (PEGDA). Nejčastějšími přírodními hydrogely v tkáňovém inženýrství jsou potom kolagen, kyselina hyaluronová, alginát a fibrin. Přírodní hydrogely mají - díky svému původu - nespornou výhodu. Buňky do nich nasazené mají receptory pro biomolekuly, ze kterých jsou tyto hydrogely tvořeny, a tak mohou s materiálem interagovat a přetvářet ho. Hydrogel také ovlivňuje chování buněk - jejich proliferaci, migraci, ale i fyzikální a chemické vlastnosti.

Syntetické hydrogely obvykle nenabízejí vazebná místa, ale jejich modifikací je

lze vytvářet podle konkrétní potřeby. Přidáním peptidových sekvencí - které slouží právě jako vazebná místa pro buňky - nebo růstových faktorů (ty ovlivňují buňčnou diferenciaci s cílem produkovat určitý druh tkáně) potom můžeme tento deficit minimalizovat, nebo naopak ovlivnit proliferaci a cíleně ovlivnit určité signální dráhy. [2]

1.2.1 Využití hydrogelů v TI

Hydrogely by měly splňovat fyzikální, chemické a biologické podmínky, stejně jako musí být dobře modifikovatelný a tvárný. Právě hydrogely se tomuto ideálnímu materiálu blíží, a to i díky tomu, že jsou svojí strukturou podobné extracelulární matrix. Vzhledem k tomu, že nosič (scaffold) je vlastně náhradou extracelulární matrix, je tato podobnost více než potřebná. [3] Nosič nemusí jenom držet buňky uspořádané v určité 3D struktuře, ale výhodnou vlastností nosiče je i schopnost indukovat u nich růst, umožnit jim vzájemnou komunikaci a poskytovat možnost výživy. Proto není důležitý jen typ materiálu, ze kterého je nosič vytvořený, ale také jeho struktura, velikost jeho pórů a kanálů.

Co se týče využití 3D biotisku v tkáňovém inženýrství, hydrogely mají nespornou výhodu v tom, že je možné je tisknout tekuté a během tisku samotného je buď fyzikálně, chemicky, nebo kombinací obou technik polymerizovat.

1.3 Vlastnosti hydrogelů určených k 3D biotisku

1.3.1 Fyzikální kritéria

Jedním z prvních kritérií je optimální viskozita jak před tiskem samotným, a to z důvodu dobrého vmíchání buněk do materiálu, tak během tisku - kvůli dobrému pohybu materiálu v tiskové soustavě, nezávisle na metodě tisku. Se zvyšující se viskozitou může docházet k smykovému (tečnému) napětí, které vyvolává stres buněk, jenž vede až k buněčné smrti, a tak snižuje viabilitu. Na druhou stranu by měl ideální materiál ihned po vytištění síťovat a ztuhnout, aby si zachoval vytvořený tvar a nedocházelo k destrukci při pokládání dalších vrstev materiálu.

Výhodu pro 3D biotisk nabízejí materiály pseudoplastické. Pseudoplasticita je vlastnost, která s viskozitou velmi úzce souvisí. Fyzika rozděluje látky podle změny jejich viskozity v závislosti na smykovém napětí na Newtonovské a Nenewtonovské tekutiny. Newtonovské tekutiny jsou takové, pro které platí Newtonův zákon viskozity

$$\tau = \eta \frac{du_x}{dy} \quad (1.1)$$

kde τ je smykovým napětím, u rychlostí toku, x souřadnicí ve směru kolmém na směr proudění a η dynamickou viskozitou, která je pro danou teplotu konstantní.

Tab. 1.1: Porovnání viskozit obecně známých kapalin a alginátu, vše při standardních podmínkách [4] Rozdílná viskozita alginátu souvisí s jeho molekulovou hmotností. [5]

látka	viskozita [mPa.s]
mléko	2
džus	50
alginát 4%	6 - 800 [5]
jogurt	150
řepkový olej	160
med	1400

Pseudoplastické kapaliny jsou potom takové, pro které s rostoucím smykovým napětím klesá viskozita. To při tisku znamená, že při průchodu tryskou, kdy vzrůstá smykové napětí, klesá viskozita, a tedy hydrogel je „tekutější“. Po vytištění smykové napětí opět klesá a roste viskozita, díky čemuž roste rozlišení tisknuté struktury - hydrogel dobře drží tvar a jsme schopni z něj vytvořit 3D strukturu. Pseudoplasticita je proto pro 3D biotisk velmi důležitou a prospěšnou vlastností. Buňky jsou

v hydrogelu před tiskem rovnoměrně rozloženy a toto rozložení si díky dostatečné viskozitě udrží.

Důležitým fyzikálním parametrem je teplota, při níž je materiál viskózní, síťuje atd. Tento parametr je důležitý vzhledem k tiskové metodě, kterou používáme, a také vzhledem k buňkám. Pokud bude příliš nízká nebo příliš vysoká, pak vystavujeme buňky zbytečnému teplotnímu stresu. Na druhou stranu je nutno teplotu posoudit i vzhledem k užívanému hydrogelu, protože bude potřeba materiál chladit, potažmo zahřívat.

Metoda polymerizace (síťování) je dalším faktorem. Polymerizace se může provádět změnou teploty, ale není vhodné používat teploty příliš vysoké (nad 42°C). U mnohých materiálů lze použít sekundární (dodatečné) síťování, a to buď fyzikální, nebo chemické. Jednou z možností fyzikálního síťování je přimíchání fotocitlivé složky do hydrogelu, po vytištění se pak struktura vytvrzuje světlem o určité vlnové délce, obvykle jde o část spektra UV záření. To však může způsobovat DNA zlomy u osvětlených buněk. Chemické síťování - např. alginátové struktury jsou obvykle smáčeny v roztoku $CaCl_2$, který strukturu vytvrzuje. Nad 100 mM může být pro buňky toxický.

Posledním kritériem je Youngův modul pružnosti, který popisuje tuhost materiálu, a to na základě poměru tlaku a deformace objektu. Čím je Youngův modul vyšší, tím je objekt - v našem případě nosič - tužší, a tedy méně deformovatelný. Bylo dokázáno, že buňky reagují na tuhost nosiče. Pokud je podobná tuhosti tkáně, diferencují optimálně. [6] Tuto veličinu lze řízeně ovlivňovat stupněm polymerizace.

1.3.2 Biologická kritéria

Biologickými faktory, které je nutné zahrnout, je hlavně podobnost extracelulární matrix, která je přirozeným prostředím buněk. Toho lze dosáhnout integrací správných vazebných motivů, růstových faktorů atd. Aby mohly buňky v nosiči po vytištění správně fungovat, potřebuje být materiál dostatečně porézní. Nejenom z důvodů jako je difuze živin a odvod odpadních látek, ale i kvůli správné komunikaci buněk. Stejně tak by měl být hydrogel degradovatelný. Rychlost rozkladu hydrogelu by měla odpovídat rychlosti vytváření extracelulární matrix buňkami - tím pádem se nerozpadne vytištěná struktura, ale degradovaný hydrogel je postupně nahrazen extracelulární matrix, kterou v mezičase buňky vyprodukují.

1.4 Přírodní a syntetické hydrogely

Kolagen

Kolagen je jeden z nejpoužívanějších materiálů pro výrobu buněčných substrátů. Je totiž častou součástí extracelulární matrix u většiny tkání. Jeho nespornou výhodou je i dobře zvládnutý proces izolace a výroby. Hlavní vlastností kolagenu je, že je strukturálním proteinem, na který se vážou další adhezivní proteiny - např. fibronectin, laminin, atd. Pokud je ale používán čistý (100%) kolagen, pak může docházet ke sníženému pohybu a migraci buněk, a to kvůli přílišné přilnavosti. In vivo není nikdy tkáň tvořena pouze kolagenem, je jen jednou z mnoha součástí tkáně. Mezi jeho další nevýhody patří výskyt hydrofobních peptidů, které pak zamezují správným buněčným výměnám, a mohou vést k buněčné smrti. I přes tyto důvody a rizika je pořád velmi používaným materiálem pro kultivaci buněčných struktur, nicméně do budoucna se dá očekávat vývoj nových hydrogelů, které budou kromě kolagenu obsahovat i další složky extracelulární matrix. [7]

Želatina

Želatina je směsí peptidových sekvencí, derivátem kolagenu vznikající jeho denaturací, díky čemuž se lehceji rozpouští v roztocích. I když si stále zachovává gelové vlastnosti při nižších teplotách, narozdíl od kolagenu taje okolo 32°C, což znemožňuje její použití při fyziologické teplotě. Pro toto využití je pak nutné provést modifikace želatiny, jako je například alternativní možnost síťování pomocí transglutamináz, nebo kombinace s jinými typy materiálů. [7]

Alginát

Alginát je přírodním polysacharidem získávaným z mořských řas. V tkáňovém inženýrství je hojně využíván zvláště kvůli snadnému formování hydrogelu. Jde o vpodstatě okamžité sesíťování reakcí sodno-vápenatých iontů. Bez dalších modifikací je alginát (podobně jako syntetické hydrogely) vpodstatě inertní pro savčí buňky a je možné jej modifikovat pro zvýšení adheze a přežití buněk. K síťování alginátu se používá $CaCl_2$, který však ve vysokých koncentracích může být cytotoxický. [7]

Fibrin

Tento polymer vzniká z fibrinogenu za pomoci trombinu, je přirozenou součástí lidského těla, kde napomáhá shlukování krevních tělísek při tvorbě sraženin. Právě díky tomu, že je přirozenou součástí plazmy (odkud se také získává), je vhodný pro použití v tkáňovém inženýrství a nemusíme se bát odmítnutí lidským tělem.

Syntetické hydrogely

Jak jsem již psal, syntetické hydrogely mají výhodu i nevýhodu v chybějících vazebných místech. Nevýhoda je nutnost hydrogely modifikovat, což se ale hned obrací ve výhodu. Díky tomu máme možnost určit, jaká vazebná místa chceme v gelu mít, a tím pádem „programovat“ buňky. Lze řídit např. jejich proliferaci, diferenciaci nebo i přežití jednotlivých typů buněk.

Polyethylen glykol (PEG) je hydrofilní materiál. Je považován za jeden z nejlepších syntetických hydrogelů pro použití v tkáňovém inženýrství, a to i kvůli dobré modifikaci konce jeho řetězce. Modifikovat lze akryláty nebo methakryláty k formování polyethylen glykol dimethakrylátu (PEGDA), který je používán hlavně díky jeho schopnosti dobře pojmout buňky. [8]

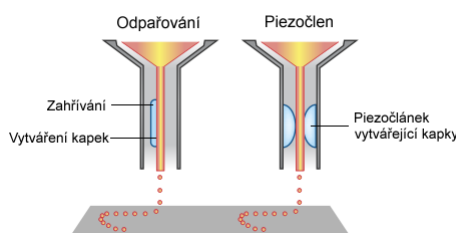
PVA, neboli polyvinyl alkohol, je dalším ze syntetických hydrogelů. Může být polymerizován buď fyzikálně, a to fotopolymerizací, nebo chemicky - reakcí s monoaldehydy. Díky volným alkoholovým skupinám se na něj dobře vážou biologické molekuly. PVA může být polymerizován společně s PEG, čímž vzniká biologicky odbouratelný hydrogel, který degraduje rychleji než PEG, ale zároveň pomaleji než PVA.

1.5 Metody manipulace s hydrogely

Co se týče vytváření struktur ve tkáňovém inženýrství, jsou dvě hlavní možnosti. První je nepřímá, kdy nejprve vytvoříme nosič, který se sekundárně osadí buňkami. Druhou cestou je potom přímá metoda, při které se cílený tvar a struktura vytvářejí již přímo s buňkami rozptýlenými v materiálu nosiče. Obě tyto metody mají svoje výhody i nevýhody a obě se používají při různých metodách a technologiích výroby nosičů. V této práci se budeme zaměřovat zejména na možnosti přímých metod tisku hydrogelu s buňkami.

Přímá metoda je samozřejmě náročnější co se týče polymerizace, vmíchání buněk, výroby(tisku) i materiálu nosiče. Je to hlavně kvůli viabilitě buněk. Z toho důvodu je potřeba, aby hydrogel ze kterého budeme nosič připravovat, poskytoval buňce prostředí podobné extracelulární matrix.

1.5.1 Planární Inkjet



Obr. 1.1: Metody inkjet biotisku [13]

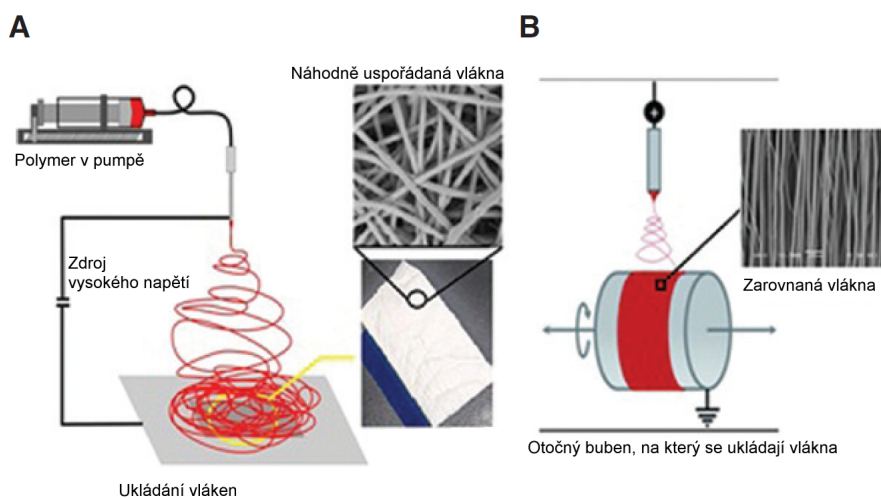
Již výše jsem zmiňoval tvarovou náročnost nosiče, kdy je nutné citlivě a přesně pracovat s materiálem, tj. hydrogelem, pro vytvoření a splnění všech požadavků. Jednou z cest, jak toho dosáhnout, je Inkjet Biotisk, který bývá nazýván i drop-by-drop, neboli drop-on-demand (DOD) tiskem. Tato technologie je použitelná jak pro vytváření 2D, tak 3D struktur. Celý princip je opravdu velmi podobný klasické inkoustové tiskárně, kdy je na podložku nanášen materiál kapku po kapce, podle předem daného počítačového modelu. Tato metoda je vhodná zvláště pro malé tiskové objemy, ale na druhou stranu nabízí vysoké rozlišení. Co se týče vytváření kapky samotné, využívají se dvě technologie. Jedna kapku odděluje pomocí odpařování, zatímco u druhé je kapka oddělená piezoelektrickým členem, který expanduje a kapku tlakem oddělí. [8]

1.5.2 Elektrospinning

Pokud se bavíme o výrobě tkaninového nosiče, pak je záhodno uvést i technologii elektrospinningu, díky které lze vyrábět vlákna v rozměrech nanometru až mikrometru, která vynikají zvláště dobrým poměrem plocha/objem, volitelnou porézní strukturou a samozřejmě právě nanorozměry.

Technologie elektrospinningu je poměrně jednoduchá, jde o použití elektrostatických sil vybuzených stejnosměrným proudem s vysokým napětím (velikosti desítek kV) k formaci vláken z polymerů, a to na principu překonání sil povrchového napětí roztoku polymeru.

V současnosti se používají dva přístupy, a to vertikální a horizontální. Rozdíl je v umístění podložky, na kterou je vlákno spřádáno, jinak je princip stejný. Máme injekční stříkačku umístěnou v ovladatelném pístu (pumpě) - jehla stříkačky je napojena na zdroj napětí, stejně jako podložka. Po sepnutí zdroje a spuštění pumpy je polymer ze stříkačky elektrickou silou způsobenou rozdílem napětí přitahován na podložku, přičemž vznikají nanovlákna. [9] Elektrospinning se provádí při pokojových teplotách a atmosférických podmínkách, což značně ulehčuje provedení procesu, i když některé zdroje [10] doporučují používat dobře ventilované prostory (kvůli výparům).



Obr. 1.2: Vertikální (A) a horizontální (B) elektrospinning [11]

Vertikální přístup (viz. Obr. 1.3) je méně náročný, ale vlákna nemají jednotné uspořádání, zatímco přístup horizontální je výhodný hlavně díky lineárnímu uspořádání vláken, i když navíc vyžaduje točící se válec, na který je polymer zachycován a kde vznikají nanovlákna.

Electrospinning s živými buňkami

Electrospinning s živými buňkami je možný, i když poměrně náročný. Zaprvé je nutné udržovat buňky v dobrém prostředí, aby „nevyschly“, a proto je během sbírání vlákna válec namáčen do média. Je potřeba myslet i na velikost procházejícího proudu a způsobit celý systém tomu, aby buňky elektrický proud nezabil. Dalším rizikem je roztrhnutí vlákna v místě buňky kvůli rozdílné hustotě. Na otáčejícím se válci by také mohlo docházet k „odpadávání“ buněk, a proto je dobré mít na jeden válec vedeno více vlánek pod různým úhlem. [12]

1.6 3D biotisk a jeho technologie

3D biotisk je 3D tiskem s použitím „náplní“ z biologického materiálu a buněk, a to v několika možných technologiích a variantách. Díky 3D biotisku můžeme vyrábět jak nosiče, tak i nosiče s buňkami, a to různých materiálů, a jak homo, tak heterologní. Pro 3D biotisk je potřeba, stejně jako u klasického 3D tisku, mít vyrobenou předlohu v CAD (Computer Aided Design) systému v počítači, která je pak softwarem převedená na kód udávající tiskárně instrukce nutné k tisku a pohybu tiskové hlavy.

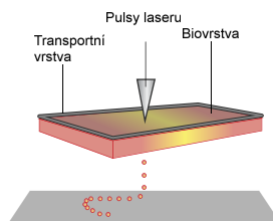
3D inkjet

Tuto technologii jsem uváděl už výše, protože je široce využívaná i co se týče 2D tisku. Její náročnost s přidáním třetí dimenze roste, je potřeba aby hydrogel rychle polymerizoval, a tak mohly být další kapky přidány do rostoucí struktury, a to bez hrozby její zhroucení nebo ztráty kvality tisku (tiskového rozlišení). Vyšší složitost se samozřejmě týká i tiskového plánu modelu, kdy je pro 3D tisk potřeba mnohem složitějšího návrhu, než pro 2D tisk. Stejně jako pro 2D variantu se používá jak technologie odpařování, tak piezoelektrická.

Laserem asistovaný biotisk

Tato metoda 3D biotisku byla původně vyvinuta pro úpravu kovů při výrobě mikročipů, a to hlavně kvůli svému vysokému rozlišení, ale rychle si našla uplatnění ve sféře tkáňového inženýrství, a to i na buněčné úrovni. Na rozdíl od ostatních není příliš vhodná pro tisk nosiče i s buňkami, ale naopak je velmi dobrá pro osazení již vytvořeného nosiče buněčnou strukturou. Celá technologie je založená na směrovaném pulzujícím laserovém paprsku, který osvětluje skleněnou desku. Na spodní straně této desky je nanесena transportní vrstva (např. zlato, titan), na níž je aplikován biologický materiál (v případě biotisku). Ve chvíli ozáření skleněné desky laserem je energie fotonů předána skrz sklo na transportní vrstvu, která energii pohltí, zahřeje se a v biovrstvě se vytvoří kapka materiálu. Ta se poté oddělí a dopadne na podložku. Pohybovat se může jak laser, tak deska nebo podložka. Biologická vrstva může být tvořena biopolymery nebo proteiny a může obsahovat i buňky. [7]

Výhodou této technologie je absence trysky, takže nehrozí ucpání, jako je tomu jinde. Díky tomu lze k tisku využívat mnohem širší spektrum materiálů a již se nemusíme omezovat např. viskozitou. Díky transportní vrstvě se nemusíme bát ani snížení viability buněk kvůli ozáření laserem. Rozlišení samozřejmě závisí jak na vlnové délce, tak na modulaci laseru, ale zároveň i na materiálu, který jsme na desku nanесли. V rámci biovrstvy jsou faktory ovlivňující rozlišení hlavně hydrofilní/hydrofobní vlastnosti a hustota buněk. [7] Svůj vliv má rozhodně i vzdálenost k podložce,



Obr. 1.3: Laserem asistovaný biotisk [13]

kdy s rostoucí vzdáleností rozlišení klesá.

Nevýhodou je potom množství tištěného materiálu, nutnost přípravy skel a cena celé soustavy. Je samozřejmě možné tisknout i s více připravenými skly, které se při tisku jen vymění (z důvodu „vyčerpání zásob“ biovrstvy), ale tato metoda v současném stavu není určena pro tisk větších objemů.

1.6.1 Extruzivní 3D biotisk

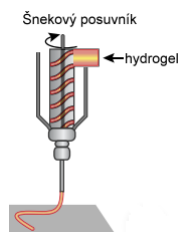
V klasickém 3D tisku je dnes asi nejpožívanější metodou FDM - Fused Deposition Modeling. Princip je jednoduchý. Plastové vlákno je v tiskové hlavě taveno a poté pokládáno vrstvu po vrstvě. Díky tomu na podložce postupně roste 3D objekt. [14]

Biologickou obdobou FDM je právě tisk extruzí (vylačováním) - v angličtině „Extrusion Based Deposition“. Narozdíl od FDM není potřeba nic tavit, biomateriál (v našem případě hydrogel) přichází do trysky a poté je pokládán na základě pohybu tiskové hlavy. Hydrogel může být do trysky tlačěn pístem, šroubem anebo tlakem vzduchu. I když nedosahuje takového rozlišení, jako Inkjet nebo Laserem asistovaný biotisk - rozlišení se uvádí kolem 200 μm [7], tak je výrazně rychlejší než obě uvedené technologie. Navíc nemá problém pracovat s většími objemy tisknutého materiálu.

Hydrogel je nutné směrem k trysce nějak pohánět, přičemž nám zároveň záleží na minimálním smykovém napětí, vysoké ovladatelnosti - kvůli přesnému dávkování materiálu - a co nejširším rozsahu možných použitelných viskozit.

Šnekový systém

Jak je patrné z názvu, šnekový systém vychází ze šneka (šroubu), který je umístěn nad tryskou a svým otáčením žene hydrogel dále. Výhoda tohoto systému je ve vysoké ovladatelnosti a dobré funkčnosti i při vyšší viskozitě. Slabým místem šnekového systému je tisk hydrogelu s rozptýlenými buňkami, protože (zvláště v blízkosti trysky) může docházet k velkým tlakům a napětím na buňky, které mohou vyústit až k smrti buňky. [7] S nárůstem zájmu o 3D biotisk se začínají objevovat i speciální šneky, které toto riziko minimalizují.



Obr. 1.4: Vytlačování pomocí šroubu [13]

Pístový systém

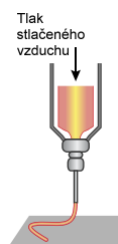
Zde lze nalézt vysokou podobnost se systémem šroubovým. U pístu však dosahujeme mírně nižší možnosti kontroly, navíc pístový systém nepracuje tak dobře s materiály s vyšší viskozitou. Na druhou stranu dosahují pístové systémy vyššího procenta přeživších buněk.



Obr. 1.5: Vytlačování pomocí pístu [13]

Pneumatický systém

Nevýhodou tohoto systému je určité zpoždění mezi zvýšením tlaku a samotným vytlačením materiálu z trysky. Je to způsobeno hlavně tím, že je nejprve nutná komprese plynu samotného, který pak může dál hnát materiál z trysky ven. Na druhou stranu je velkou výhodou možnost použití jak nízko, tak vysokoviskózních hydrogelů. Samotný systém vytvářející pneumatický polštář pak může být uložen mimo tiskovou hlavu, čímž se snižuje fyzická zátěž hlavy a její vibrace, což má přirozeně kladný dopad na kvalitu tisku a staví pneumatický systém nad systémy používající šroub nebo píst.



Obr. 1.6: Vytlačování pomocí pneumatického systému [13]

1.7 Vybavení pro 3D biotisk

Než přejdu k praktické části mé bakalářské práce, chtěl bych se ještě zmínit o ideálním vybavení pro 3D tisk biologických struktur. Vzhledem k tomu jak široký pojem „3D biotisk“ je, tak i ideální vybavení bude pro jednotlivé technologie a materiály rozdílné. Proto se budu primárně zaměřovat na 3D biotisk nízkoviskózních hydrogelů technologií extruze, ale občas si dovolím i poznámku k jiným materiálům a technologiím.

1.7.1 Extruzivní metoda

Za nejlepší v poměru cena/výkon pro práci s nízkoviskózními hydrogely považuji právě tuto technologii/metodu. Je to z několika důvodů. Prvním je cena - jak Inkjet, tak Laserem asistovaný biotisk jsou mnohem nákladnější jak na pořízení, tak na provoz. Navíc tato technologie dosahuje výhodného poměru co se týče prostorového rozlišení vs. možného tiskového objemu, takže jsme schopni vytisknout i větší části tkáně, a není potřeba tisk přerušovat. Dalším důvodem je možnost tisknout jak nosič samotný, který později osadíme buňkami, tak i přímo nosič s buňkami v jednom tisku. Oproti Inkjetu pak tato metoda umožňuje lépe měnit velikost trysky, což může být výhodné (např. pokud zrovna tiskneme nosič - použijeme tedy větší trysku - pro buňky potom menší). Tato technologie má také nižší nároky na přípravu tisku. Na rozdíl od laseru není nutno připravit desku s biovrstvou, desinfekce a čištění tiskové hlavy je zase o mnoho jednodušší než u Inkjetu, k čemuž se ještě dostanu.

1.7.2 Tisková podložka

Biotisk samotný probíhá na podložku, která by měla udržovat teplotu vhodnou pro tisk - co se týče prostorového rozlišení materiálu (podle typu hydrogelu, a jeho síťovacího činidla), ale i co se týče buněk samotných, které samozřejmě v ideálním případě vyžadují fyziologickou teplotu 37 °C. K ideální tiskové teplotě je ještě nutné podotknout, že by měla reflektovat teplotu buněk před tiskem samotným. Pokud

by totiž rozdíl teplot před a při tisku dosahoval moc vysokých hodnot, může to vyvolat teplotní stres buněk, což opět nepříznivě ovlivní viabilitu systému. I když tisk samotný většinou probíhá do laboratorní misky, je možné tisknout i na živý preparát - například tisk fibroblastů přímo na laboratorní myš, jako například v tomto výzkumu [15]. Je také možný tisk do gelu, případně do jiného média, a to z různých důvodů - např. lepší síťování, okamžitý přístup živin k buňkám, zvýšená poréznost hydrogelu atd.

1.7.3 Systém extruze

Jak jsem psal výše, existují tři hlavní systémy extruze, a to šnekový, pístový a pneumatický. Za nejlepší z nich považuji pneumatický, protože nám umožňuje umístit pohon systému mimo tiskovou hlavu, což snižuje její vibrace a zatížení. Nevýhodou tohoto systému je časová odezva jak u spuštění, tak u zastavení tisku. Nepříjemné je to zvláště v případě zastavení tisku, kdy dochází k vytištění více materiálu, než je zamýšleno. S tím souvisí vliv gravitace, která může „odkap“ ještě zvětšit. Tento patologický artefakt lze eliminovat použitím zpětného chodu, ne vždy je to ale úspěšné. Zpětný chod je další z výhod pneumatické metody, kdy můžeme hydrogel nejdříve nasát do tiskové hlavy a pak z něj tisknout, není nutné jej „loadovat“ do tiskové hlavy jinudy ani řešit jeho transport ze zásobníku.

1.7.4 Výzvy 3D tisku

Tryska

Tryska je sice nezbytnou, zato velmi problémovou součástí 3D tiskárny. Zaprvé jde o její problematické čištění a údržbu. Proto je dobré trysky s každým tiskem měnit, minimálně je však nutná desinfekce a propláchnutí. Vzhledem k síťování hydrogelů se tryska může ucpávat, což způsobuje chyby tisku. Tryska musí být dostatečně velká, aby jí prošly buňky a neničila je, zároveň ale dost malá, abychom dosahovali dobrého rozlišení tisku.

Tisk nízkoviskózních hydrogelů

Nízká viskozita tištěného materiálu má svoje výhody i nevýhody. Mezi výhody určitě patří nízké smykové napětí během pohybu hydrogelu v tiskové hlavě, stejně jako menší šance ucpání trysky. Hlavním důvodem pro tisk z hydrogelů s nízkou viskozitou je ideální tuhost pro kultivaci buněk. Nevýhody jsou v heterogenitě směsi hydrogelu a buněk, po průchodu tryskou se tato směs může v místě buňky kvůli rozdílné hustotě roztrhnout. Proto je potřeba optimalizovat tiskový proces a přesnou koncentraci všech obsažených látek. Velkou výzvou je samovolné vytékání z trysky v

závislosti na jejím průměru a povrchovém napětí materiálu. To znehodnocuje finální struktury a navíc zvyšuje spotřebu materiálu, jelikož se pracuje s desetinnými až desítkami mikrolitru buněčné suspenze. Další zásadní nevýhodou je, že tyto materiály nedrží po tisku tvar.

Jak samovolné vytékání, tak zachování tvaru lze ovlivnit změnou teploty hlavy a tisknutého materiálu při tisku, což však některé komerčně dostupné tiskárny nenabízejí. Tím se také budu zabývat v praktické části své práce.

1.8 Cíle práce

Mým úkolem v rámci této bakalářské práce bylo vhodně modifikovat a rozšířit vybavení laboratoří Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Ústav disponuje biotiskárnou GeSim - BioScaffolder. Tato tiskárna využívá extruzivní metody tisku, kterou jsem již popisoval. Samotná extruze probíhá na pneumatickém principu a tisková hlava nabízí tisk až tří na sobě nezávislých materiálů. Tiskárna je však vhodná zejména k tisku materiálů s viskozitou nad 10 mPas a tím pádem při tisku nízkoviskózních hydrogelů dochází k výraznému poklesu prostorového rozlišení.



Obr. 1.7: GeSim BioScaffolder [16]

1.8.1 Definice problému

Pro námi vyžadovaný tisk je potřeba tiskárnu modifikovat tak, aby zvládala tisknout dostatečně přesně nízkoviskózní hydrogely, navíc v malých objemech (jde o průtok řádově v $\mu\text{l}/\text{min}$), a to bez odkapávání během tisku. Pro lepší síťování je navíc vhodné použít hydrogely, které síťují jak chemickou, tak i fyzikální cestou. Tedy za použití síťovacího činidla a změny teploty zároveň. Proto bude nutné do hlavy zakomponovat i chlazení. Mimo to je potřeba vyřešit pohonný systém hydrogelu. Tiskárna využívá pneumatický systém a ten by bylo vhodné využít ho pro spínání našeho systému.

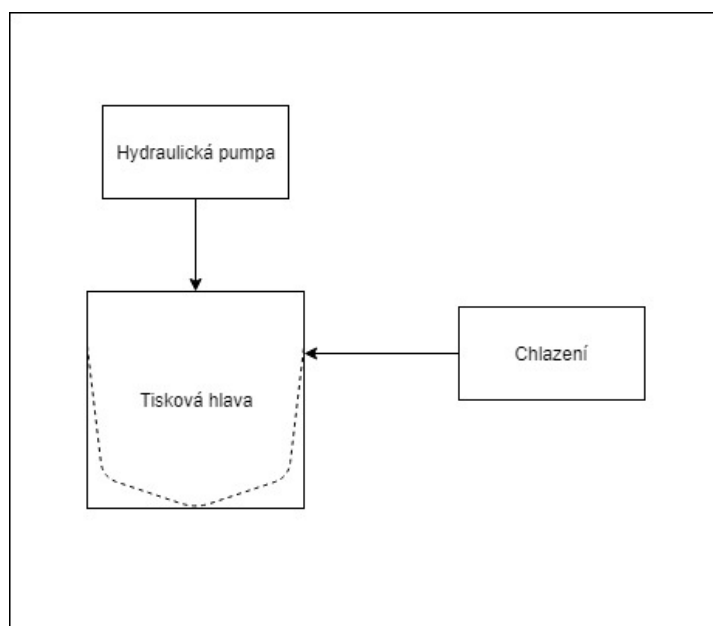
Tomuto problému se již dříve věnoval Ing. Mário Kandra[17], ale jeho řešení nedosahovalo požadovaných výsledků. Pokusil jsem se proto poučit z jeho chyb a řešil jsem celý problém odlišným způsobem. Ačkoliv jeho systém skýtá několik výhod, během provozu byly odhaleny některé nevýhody pro nízkoviskózní materiály, a to zejména projevení vlivu vibrací (způsobených motorem) na tisk samotný a náhodná nekompatibilita se systémem tiskárny.

2 PRAKTICKÁ ČÁST STUDENTSKÉ PRÁCE

2.1 Řešení tiskové hlavy

Na základě literární rešerše jsem se rozhodl navrhnout řešení nástavbou současné hlavy pomocí insertu, který bude vložen do tiskové kazety současné tiskové hlavy. Externě pak bude umístěná hydraulická pumpa, která tlačí hydrogel do insertu.

Kompletní design insertu by měl zahrnovat také možnost chlazení hydrogelu a buněk, avšak jeho realizace je v přípravě a bude uskutečněna v rámci navazující DP.



Obr. 2.1: Blokové schéma celého systému

Samotný hydrogel bude tlačенý kapalinou, jde tedy o hydraulický systém vycházející z pneumatického. Využívá výhod obou systémů. Toho je docíleno vytvářením tlaku na kapalinu, která je oddělena vzduchovou bublinou od samotného hydrogelu. Kapalina, a díky tomu sekundárně i hydrogel samotný, je tlačěn pístem. Proto jde o kombinaci pneumatického a pístového systému extruzivního 3D biotisku. Pro lepší prostorové rozlišení (a zároveň abychom předešli hmotnostnímu zatěžování hlavy) je vhodné umístit pohon pneumatického systému mimo tiskovou hlavu. Moje řešení sestává z hydraulického pohonného systému. Tím je pumpa s pístem, do které se dá vložit injekční stříkačka velikosti 1 ml a 5 ml. Pumpa je řízená mikrokontrolérem Arduino a její pohyb zajišťuje krokový motor. Pro zamezení odkapu a jednodušší zavádění hydrogelu tato pumpa disponuje i zpětným chodem. Celá pumpa je vlastní výroby a plastové součásti jsou vyrobeny na 3D tiskárně. Pumpu lze ovládat pomocí

sériové linky z počítače, ale elektronika je rozšiřitelná o pneumatické čidlo, které by převádělo impulzy z tiskárny na změny napětí, což by pumpu začlenilo do systému celé tiskárny.

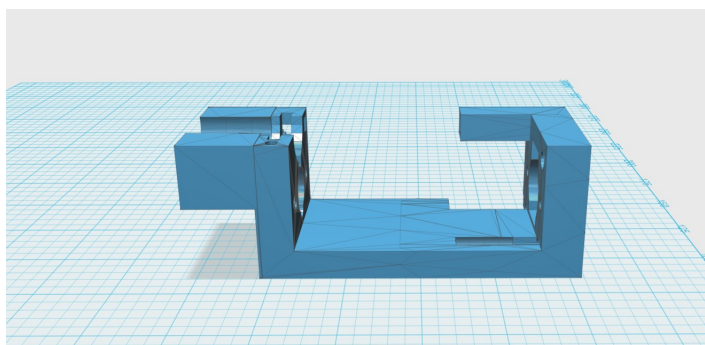
Jedním z hlavních výhod celého systému je jeho vysoká modularita a (díky výrobě na 3D tiskárně) možnost upravovat jednotlivé díly, a tím stále zlepšovat systém tisku. Možnost tisknout z více hydrogelů zároveň je v originálním řešení tiskárny umožněna dvěma zásobníky na hlavě tiskárny. Pokud tedy chceme tuto možnost zachovat i pro naši modifikaci, stačí použít inserty dva, každý do jednoho zásobníku, a k nim dvě hydraulické pumpy, které budou systém pohánět.

2.2 Hydraulická pumpa

Úkolem hydraulické pumpy je tlačit směs hydrogelu a buněk. To se děje díky krokovému motoru, který otáčí trapézovým šroubem. Na šroubu je umístěn píst, který se posouvá na základě otáčení šroubu. Toto jsou pevné součásti pumpy, ale pumpa samotná nabízí možnost modifikace, a to podle toho, jestli je do ní vložena jedno, nebo pět mililitrová injekční stříkačka. Ta je naplněna kapalinou, která slouží k vytlačování samotného hydrogelu s buňkami.

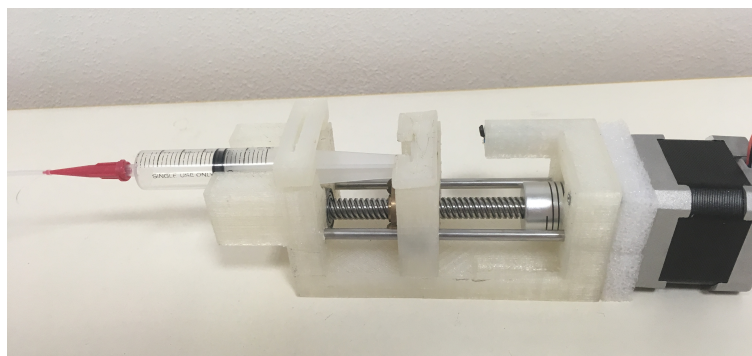
2.2.1 Konstrukce

Základem hydraulické pumpy je plastová kostra, která byla vytvořena v CAD software a následně vytisknuta na 3D tiskárně. Celkově tato kostra prošla 4 modifikacemi, kdy jsme postupně optimalizovali jednotlivé parametry. Kostra umožňuje uchycení krokového motoru, trapézového šroubu a dvou nerezových vodících tyčí, které jsou v konstrukci zahrnuty kvůli snížení zátěže na trapézový šroub, a dohromady s ním tvoří lineární vedení, po kterém se pohybuje píst pumpy. V těle pístu je umístěna matka pro pohyb po šroubu a dále dvě ložiska, také tisknutá na 3D tiskárně, která zajišťují hladký a stabilní pohyb po vodících tyčích.



Obr. 2.2: Návrh pumpy v CAD softwaru 123D Design

V horní části pístu pumpy najdeme otvor pro uchycení injekční stříkačky, kterou lze dále upevnit přídatnou záklopkou. V pravém horním rohu je otvor pro neodymové magnety. Pokud je píst posunutý do „minimální“ pozice - tedy nejbližší motoru, jak jen to jde - nasedají tyto magnety přímo na kvádr vystupující ze zadní části kostry. Ve frontální části tohoto kvádru je totiž umístěna Hallova sonda, která detekuje magnetické pole. Pokud se hodnota magnetického pole dostane mimo povolený rozsah, řízení pumpy vyhodnotí, že píst je ve své minimální poloze, a motor přestane otáčet šroubem. Tím je zajištěn pohyb pístu jen do pozice, kdy není vytvářen tlak na konstrukci samotnou, což šetří všechny dílčí prvky pumpy, od motoru po plastovou kostru.



Obr. 2.3: Poslední prototyp hydraulické pumpy

2.2.2 Zapojení

Hlavním řídicím prvkem systému je Arduino Nano. Na Arduino je digitálních PWM pinech připojen driver krokového motoru DRV8825 od společnosti Pololu. Driver mění signály Arduina na povely pro cívky krokového motoru a zároveň i krokový motor napájí. A to díky dvěma odděleným interním okruhům, jedním s napětím 5.5V, které si bere z Arduina, a druhým 12V, které si bere ze zdroje. K motoru je poté připojen čtyřmi vodiči, dvěma ke každé dvojici cívek, protože jde o bipolární motor.

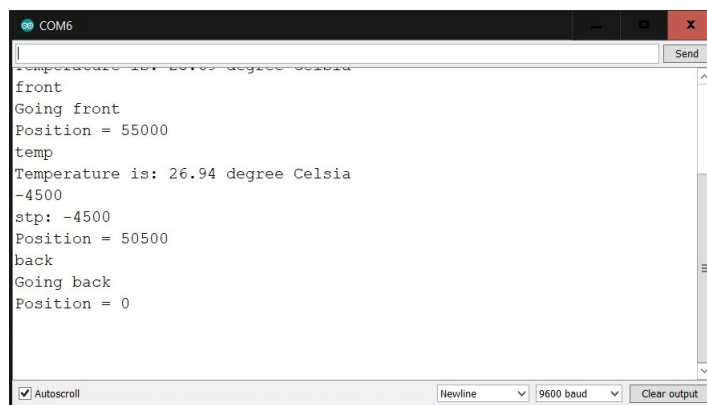
O kontrolu vzdálenosti se stará Hallova sonda, která je napájena z Arduina a data odesílá na analogový pin, kde se z velikosti napětí přepočítává síla magnetického pole.

Po domluvě s vedoucím práce (a vzhledem k tomu, že v práci na projektu budu pokračovat v rámci řešení práce diplomové) jsem celé zapojení provedl pouze na nepájivé pole, a to pro ověření funkčnosti. K zapojení byly použity tyto součástky:

- Arduino Nano
- Stepper Motor Driver DRV8825
- Laboratorní zdroj napětí 12V DC/20A
- Krokový motor NEMA 17 od firmy Microcon
- Hallova sonda 4935L
- Rezistor $100k\Omega$
- Kondenzátor elektrolytický $100\mu F$

2.2.3 Řízení

Řízení pumpy probíhá pomocí mikrokontroléru Arduino, a to v zapojení popsaném výše. V Arduinu samotném je nahraný můj vlastní kód (přiložený k práci na CD). Při spuštění systému dojde nejprve k přeměření magnetického pole. Pokud hodnota pole převyšuje hodnotu v kódu uvedenou, je spuštěna smyčka ve které motor točí



Obr. 2.5: Screenshot serial monitoru

Vytlačený objem destilované vody byl nasán papírem, což vyvolalo změnu váhy, kterou jsem odečetl a zaznamenal. Destilovaná voda byla zvolena kvůli jednoduchému převodu mezi hmotností a objemem, kdy se 1 mg vody rovná 1 μl .

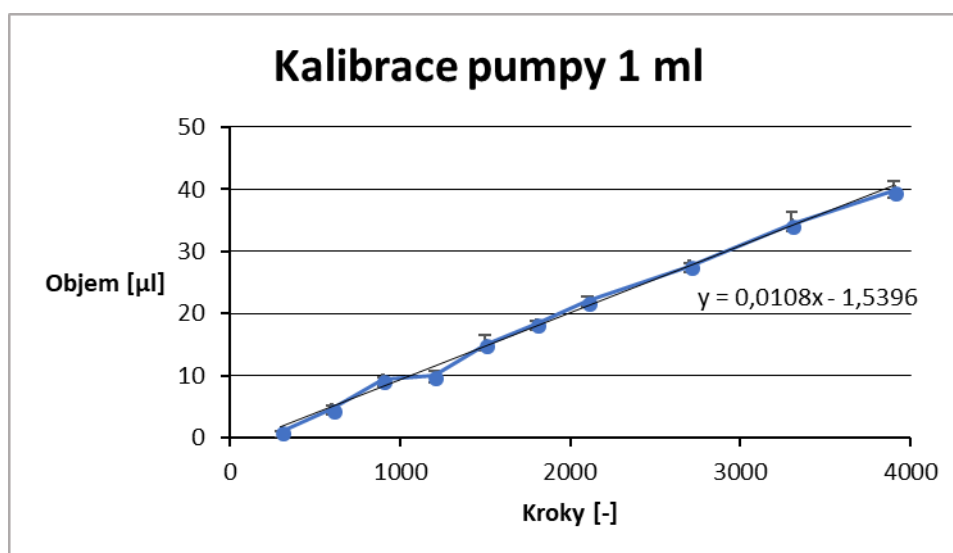
Měření jsem vypracoval pro injekční stříkačky o objemech 1 ml a 5 ml, na které je pumpa určena a které budou používány pro tisk samotný. Pro každý počet kroků jsem měření prováděl třikrát, resp. u 5 ml stříkačky 4x, pro zlepšení přesnosti výsledků. Vycházel jsem z předpokladu, že u 5 ml stříkačky je pro vytlačení stejného objemu potřeba menší počet kroků, což může vést k větším nepřesnostem, a to vzhledem k nutnosti překonat odporové síly na začátku pohybu. Dalším prvkem zkreslení je pružnost gumy na pístu stříkačky, která způsobuje setrvačnost pohybu. Počet kroků byl u obou měření koncipován tak, aby se začínalo na minimálním rozlišení váhy a dále pokračovalo v násobcích. Poslední tři měření vždy probíhala pro vyšší počty kroků, a to z důvodu lepšího proložení přímkou.

Z grafu můžeme vidět, že jde opravdu o lineární závislost, kterou můžeme dále využít pro samotný tisk.

Graf opět potvrzuje lineární závislost, v tomto případě vidíme větší odskok na hodnotě 300 kroků, což může být způsobeno nečistotou na šroubu nebo špatným promazáním.

Tab. 2.1: Výsledky měření kalibrační křivky pro stříkačku 1 ml

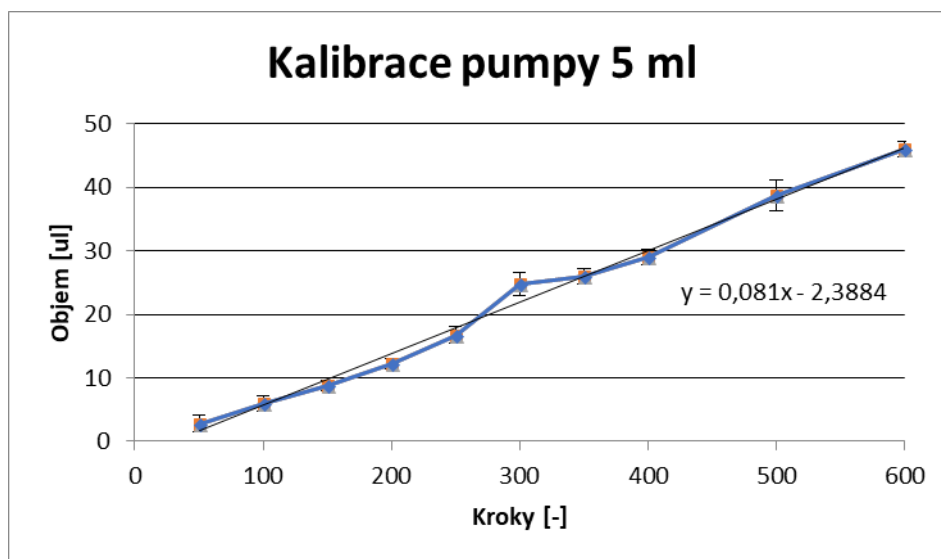
Stříkačka 1 ml					
Kroky	Objem [μ l]	Objem [μ l]	Objem [μ l]	Arit. p. [μ l]	σ
300	1	1	1	1	0,00
600	5	4	5	4,67	0,58
900	9	10	9	9,33	0,58
1200	10	11	9	10,00	1,00
1500	13	15	17	15,00	2,00
1800	19	18	18	18,33	0,58
2100	21	23	22	22,00	1,00
2700	28	27	28	27,67	0,58
3300	34	37	32	34,33	2,51
3900	39	42	38	39,67	2,08



Obr. 2.6: Kalibrační křivka pro stříkačku o objemu 1 ml

Tab. 2.2: Výsledky měření kalibrační křivky pro stříkačku 5 ml

Stříkačka 5 ml						
Kroky	Objem [μ l]	Objem [μ l]	Objem [μ l]	Objem [μ l]	Arit. p. [μ l]	σ
50	1	4	4	2	2,75	1,50
100	6	8	5	5	6,00	1,42
150	9	10	8	8	8,75	0,96
200	11	12	13	13	12,25	0,96
250	16	16	16	19	16,75	1,50
300	22	25	25	27	24,75	2,06
350	25	25	28	26	26,00	1,42
400	28	28	29	31	29,00	1,42
500	37	37	43	38	38,75	2,82
600	46	47	47	44	46,00	1,42



Obr. 2.7: Kalibrační křivka pro stříkačku o objemu 5 ml

2.3 Tiskový insert

Tiskový insert jsem se rozhodl zasadit do kazety tiskárny, kvůli její dobré tepelné izolaci, které mohu využít k zmírnění nároků na výkon chladicího okruhu. Vzhledem k rozsahu práce jsem zatím vyrobil plastový prototyp.



Obr. 2.8: Tiskový insert, modelováno v Autodesk Fusion 360

Insert samotný vypadá jako válec se spirálovitou drážkou pro hadičku po svém obvodu a se závitem pro uchycení trysky pro tisk na spodní straně. Uvnitř těla insertu je dutina, ve které cirkuluje chladicí kapalina. Do drážky na obvodu se uchytí hadička, do které bude před začátkem tisku (za pomoci zpětného chodu) natažena tisková směs. Díky tomu, že hadička nebude pevnou součástí insertu, lze hadičku vyměňovat, čímž odpadá problémová desinfekce a čištění. Koncovou částí insertu je napojení na trysku, a to systémem Luer lock. Tiskárna Gesim má na tiskové hlavě dvě místa pro kartuš s tiskutým materiálem a obě tyto kartuše jsou tepelně izolované, proto je ideální do nich inserty vložit. Použitím jedné nebo obou kartuší lze volit mezi jedno nebo více materiálovým tiskem.

V současnosti je optimalizován vhodný materiál a modifikace designu insertu pro optimální tepelnou výměnu a realizaci. Návrh a modelování insertu jsem prováděl sám, a to za pomoci CAD programu Fusion 360. Díky tomu bylo možné vymodelovat přesné rozměry, které potřebujeme, abychom dosáhli funkčnosti celého systému.

2.4 Chladicí okruh

Mimo rozsah zadání bakalářské práce jsem vypracoval funkční model chlazení celého systému, který sestává z chladicí jednotky - Peltierova článku, napojeného svojí horkou stranou na aktivní chlazení ventilátorem a svojí chladnou stranou na radiátor, kterým žene čerpadlo chladicí kapalinu. Z radiátoru tato kapalina pokračuje právě do tiskového insertu, kde chladí tisknutý hydrogel. Samozřejmostí je propojení jednotlivých částí hadičkami. Navíc je součástí i expanzní nádoba, která slouží k uvolnění vzduchových bublin z oběhu. Toto chlazení umožňuje vyšší variabilitu v modifikaci hydrogelu, čímž lze dosáhnout lepšího tisku, a to jak ze strany biologické, tak co se týká rozlišení.

Chladicí jednotka se skládá z radiátoru, tedy hliníkového boxu, kterým protéká chladicí kapalina. Radiátor, resp. chladicí kapalina v něm, je chlazená Peltierovým článkem. Peltierův článek vytváří teplotní rozdíl mezi teplou a chladnou stranou. Rozdíl teplot jednotlivých stran je určen jak článkem samotným, tak napětím, které je na něj připojeno. Podle datasheetu by měl být tento rozdíl u článku, který používáme, cca 50°C - pro napětí 12V.

Pokud tedy chceme dosáhnout co nejnižších teplot na chladné straně, je důležité chladit stranu teplou. Proto jsem se rozhodl na článek připojit rozměrný chladič se systémem heat-pipes, který je navíc doplněn ventilátorem s frekvencí 1700 otáček za minutu. Díky této sestavě je možné se na chladné straně Peltierova článku dostat i na teploty kolem 0°C .

Požadovaná teplota chladicí kapaliny je v rozmezí $0-4^{\circ}\text{C}$, protože hydrogel samotný je pro dosažení ideálních vlastností potřeba chladit pod 8°C .

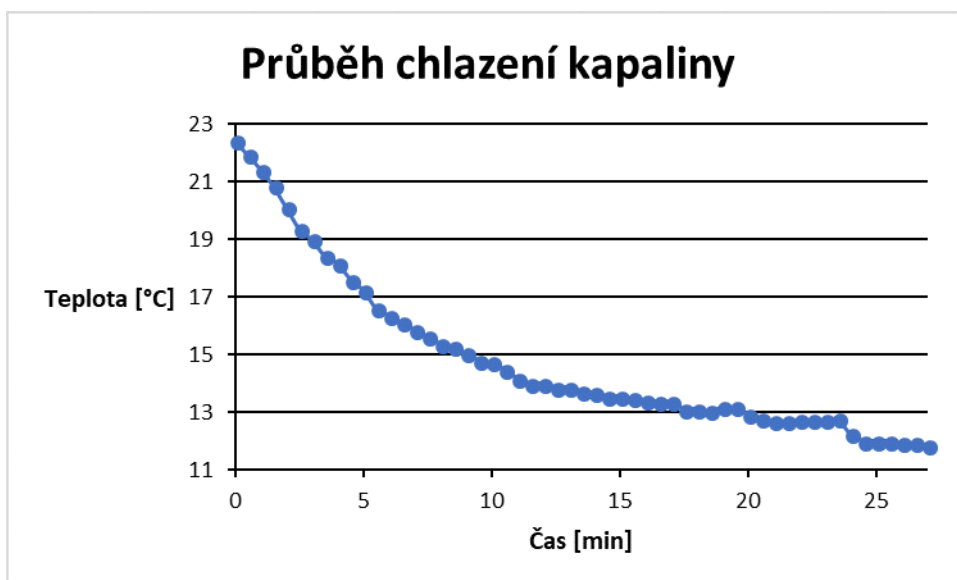
Poslední částí sestavy je mikročerpadlo, které pracuje v rozmezí 3-12V. Regulace otáček čerpadla probíhá právě změnou napětí, proto jsem se před čerpadlo rozhodl zařadit kombinaci potenciometru a MOSFETu, kdy potenciometrem měním napětí na MOSFETu, který mění napětí na pumpě samotné. V případě použití pouze potenciometru, například v děliči napětí, by potenciometrem procházely příliš velké proudy. Na druhou stranu je MOSFET výkonová součástka, která je k velkým proudům uzpůsobena a v kombinaci s pasivním chladičem není problém dlouhodobého používání i při vyšších proudech.

Pro ověření funkčnosti celého principu chladicího okruhu jsem provedl měření. To spočívalo v nastavení minimálních otáček, tj. napětí 3V na vstupu čerpadla, a poté měření teploty v expanzní nádobě v intervalech půl minuty.

Naměřené výsledky jsem zpracoval do grafu (Obr. 2.11), který znázorňuje postupné klesání teploty s přibývajícím časem měření. Ke konci měřeného úseku můžeme vidět určitou stabilizaci na teplotě okolo 12°C . To je pro naše účely bohužel nedostačující. Proto navrhuji zvýšit chladicí výkon zdvojením celého chladicího bloku,

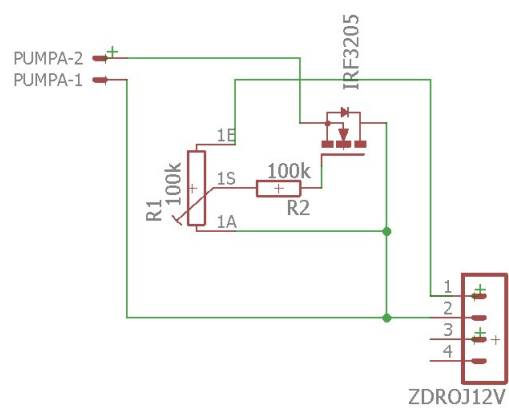


Obr. 2.9: System chlazení



Obr. 2.10: Graf popisující chlazení systému

tj. umístění Peltierova článku s aktivním chlazením z obou stran radiátoru.



Obr. 2.11: Schéma zapojení regulátoru napětí pro ovládání otáček pumpy

2.5 Diskuze výsledků

Mým úkolem bylo navrhnout a realizovat jak tiskovou hlavu pro tisk více hydrogelů v jedné úloze, tak elektronickou část pro ovládání hlavy.

Vzhledem k tomu, že modifikovaná tiskárna má dvě nezávislé hlavy, rozhodli jsme se pro návrh a realizaci insertů, které lze do hlav implementovat. Do mnou navrženého insertu je hydrogel nasávaný a vytlačovaný pomocí hydraulické pumpy, která je umístěna mimo tiskovou hlavu. Tím je eliminována zátěž na pohyb tiskové hlavy a možné vibrace (způsobené motorem pumpy) při vytlačování materiálu. Do systému byla zařazena také možnost chlazení hydrogelu, což rozšiřuje spektrum použitelných materiálů pro 3D biotisk. Zejména se jedná o materiály, u kterých se viskozita zvyšuje s teplotou. Výhodou tohoto systému je modularita jednotlivých dílů, které lze zaměnit, či upravit.

3 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem nejprve krátce rozebral problematiku 3D biotisku pro tkáňové inženýrství, jednotlivé hydrogely ze kterých je možné tisknout, stejně jako rozdíly mezi přímou a nepřímou metodou tisku. Poté jsem se zaměřil na vysvětlení tiskových technologií.

V další části jsem poté rozebíral vybavení pro 3D biotisk a poukázal na největší výzvy pro tisk hydrogelů s nízkou viskozitou. Vhodnou technologií byla zvolena extruze, také s ohledem na současné dostupné vybavení.

Praktická část začíná návrhem vhodného vylepšení 3D biotiskárny Ústavu histologie a embryologie, a to modifikací stávajícího vybavení. Jde především o vytvoření insertu tiskové hlavy a pneumaticko-pístovým systémem pohonu hydrogelu.

Nad rámec zadání práce jsem vytvořil koncepci a realizoval počáteční fázi řešení chlazení tiskové hlavy.

LITERATURA

- [1] Fergal J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, In Materials Today, Volume 14, Issue 3, 2011, Pages 88-95, ISSN 1369-7021
- [2] MALDA, Jos, Jetze VISSER, Ferry P. MELCHELS, Tomasz JÜNGST, Wim E. HENNINK, Wouter J. A. DHERT, Jürgen GROLL a Dietmar W. HUTMA-CHER, 2013. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabri-cation. Advanced Materials [online]. 25(36), 5011-5028 [cit. 2017-11-11]. DOI: 10.1002/adma.201302042. ISSN 09359648.
- [3] Jeanie L. Drury, David J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: sca-fold design variables and applications, In Biomaterials, Volume 24, Issue 24, 2003, Pages 4337-4351, ISSN 0142-9612, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5).
- [4] https://www.buerkle.de/files_pdf/wissenswertes/viscosity_en_2016.pdf
- [5] Kong et al., 2003
- [6] ENGLER, Adam J., et al. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness. J Cell Biol, 2004, 166.6: 877-887.
- [7] ATALA Anthony, YOO J. James. Essentials of 3D biofabrication and translation. 1st ed. Academic Press, 2015. ISBN 978-0128009727.
- [8] ZHANG, Lijie Grace. 3d bioprinting and nanotechnology in tissue engineering. Boston, MA: Elsevier, 2015. ISBN 9780128005477.
- [9] BHARDWAJ, Nandana; KUNDU, Subhas C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. Biotechnology advances, 2010, 28.3: 325-347.
- [10] HUANG, Zheng-Ming, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Composites science and technology, 2003, 63.15: 2223-2253.
- [11] WANG, Su-Xi, et al. Electrospinning: a facile technique for fabricating func-tional nanofibers for environmental applications. Nanotechnology Reviews, 2016, 5.1: 51-73.
- [12] JAYASINGHE, Suwan N. Cell electrospinning: a novel tool for functionalising fibres, scaffolds and membranes with living cells and other advanced materials for regenerative biology and medicine. Analyst, 2013, 138.8: 2215-2223.
- [13] <http://www.labromancy.com/>

- [14] CANESSA Enrique, FONDA Carlo, ZENNARO Marco. Low-cost 3D Printing for Science, Education and Sustainable Development. 1st ed. ICTP, 2013. ISBN 92-95003-48-9.
- [15] CUBO, Nieves, et al. 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. *Biofabrication*, 2016, 9.1: 015006.
- [16] <https://gesim-bioinstruments-microfluidics.com>
- [17] KANDRA, Mário 3D tisk kmenových buněk a analýza mikroskopických obrazů : diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2017. 70 s.